



Avaliação da atividade antiproliferativa dos encapsulados de goji berry

Evaluation of the antiproliferative activity of goji berry encapsulates

Emanuel do Vale Silva¹, Isabella Salvat Luccas², Rubia Michele Suzuki³, Elisângela Dusman⁴, Eduardo Michel Vieira Gomes⁵

RESUMO

O aumento dos números de diagnósticos de câncer atrelado aos intensos efeitos colaterais dos tratamentos convencionais fez com que os tratamentos alternativos ganhassem muito destaque. Assim, diversos estudos vêm sendo feitos sobre o tratamento de câncer com drogas medicinais, como os alimentos funcionais. O *Lycium barbarum*, também conhecido como goji berry, é um desses alimentos. Eles são considerados superalimentos pois possuem compostos como carotenoides e antioxidantes que podem prevenir doenças, como o câncer. Dessa forma, o presente estudo avaliou a atividade citotóxica, para células tumorais hepáticas humanas (HuH7.5), pelo teste do MTT, de encapsulados contendo 5, 10 e 20% de extrato de goji berry, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. O extrato encapsulado de goji berry apresentou citotoxicidade, principalmente na maior concentração de extrato (20%), sendo que no tempo de 24 horas foi possível observar esta atividade para todas as concentrações avaliadas deste encapsulado (1, 5, 10, 25, 75 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Por meio disso, confirmou-se a citotoxicidade dos extratos encapsulados de goji berry. Entretanto, sugere-se que novos estudos sejam realizados com outras linhagens tumorais buscando o melhor uso para o extrato.

PALAVRAS-CHAVE: citotoxicidade; encapsulamento; goji berry.

ABSTRACT

The increase in the number of cancer diagnosis linked to the intense side effects of conventional treatments has made alternative treatments gain much prominence. Thus, several studies have been carried out on the treatment of cancer with medicinal drugs, such as functional foods. *Lycium barbarum*, also known as goji berry, is one of these foods. They are considered superfoods because they contain compounds such as carotenoids and antioxidants that can prevent diseases such as cancer. Hence, the present study evaluated the cytotoxic activity for human liver tumor cells (HuH7.5) using the MTT test, of encapsulates containing 5, 10 and 20% goji berry extract, in periods of 24, 48 and 72 hours. The encapsulated goji berry extract showed cytotoxicity, especially at the highest extract concentration (20%), and within 24 hours it was possible to observe this activity for all evaluated concentrations of this encapsulated product (1, 5, 10, 25, 75 and 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Therefore, the cytotoxicity of encapsulated goji berry extracts was confirmed. However, it is suggested that new studies be carried out with other tumor lines seeking the best use for the extract.

KEYWORDS: cytotoxicity; encapsulation; goji berry.

INTRODUÇÃO

“Câncer” é o nome dado a um grupo de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado das células (INCA, 2022a). O aparecimento do câncer é multifatorial, existem diversas causas internas (hormônios, condições relacionadas à

¹ Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: emanuels@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2165130085763931.

² Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: isabellasalvat@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4550213018209855>.

³ Docente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: rubiasuzuki@utfpr.edu.br. ID Lattes: 3718123505118681.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Física, Estatística e Matemática. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardogomes@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7293677011271209.



imunidade e mutações genéticas) e causas externas (ambientes laborais, sociais, culturais e de consumo) que podem interagir entre si e iniciar o seu desenvolvimento. Contudo, entre 80% e 90% dos casos de câncer estão ligados às causas externas (INCA, 2022b).

Uma das formas de prevenção do câncer é uma alimentação rica em alimentos de origem vegetal (INCA, 2022c). Neste sentido, os alimentos funcionais desempenham um papel de extrema importância. Estes, são alimentos que além de suas funções nutricionais básicas, oferecem benefícios físicos, mentais e fisiológicos devido a sua composição rica em antioxidantes e carotenoides (BRUNORO e ROSA, 2016).

Desse modo, a *Lycium barbarum*, também conhecida como goji berry, representa uma função de grande relevância. A goji berry é uma fruta de origem asiática, mais especificamente da China e do Tibete, e ganhou destaque por ser utilizada na medicina tradicional chinesa no fortalecimento do sistema imunológico (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011; KULCZYNSKI e GRAMZA-MICHALOWSKA, 2016; VIDAL et al., 2012). Ela é considerada um “superalimento” devido às altas quantidades de compostos fenólicos e carotenoides (WANG et al., 2010).

A utilização de encapsulados de lipossomos é necessária pois eles são responsáveis por proteger o antígeno carregado do ambiente externo, evitando que ele seja degradado (BO et al., 2019). Ademais, por possuírem um sistema de administração de medicamentos muito eficiente e por terem grande afinidade com as membranas biológicas, são utilizados amplamente no campo farmacêutico (CHANG e YEH, 2012; LI et al., 2009).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica do extrato de goji berry encapsulado, pelo teste do MTT, em células tumorais hepáticas humanas (HuH7.5).

METODOLOGIA

Para realizar o teste da atividade citotóxica foi utilizado o ensaio MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide], de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células HuH7.5. Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 μ L de meio completo para os grupos: controle negativo (CO⁻) (meio de cultura), controle positivo (CO⁺) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 μ M) e os tratamentos com as concentrações de 1, 5, 10, 25, 75 e 100 μ L mL⁻¹ dos encapsulados do goji berry (*Lycium barbarum*). Os encapsulados avaliados eram lipossomos, contendo 5%, 10% e 20% de extrato de goji berry e Lipídio Phospholipon 80h, que foram produzidos grupo de pesquisa da UTFPR-Apucarana.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg mL⁻¹) e, então, incubadas novamente por mais 4 horas. Em seguida, foi descartado o meio contendo MTT e aos poços foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 492 nm.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos ao teste de normalidade, à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de comparação de médias de Dunnet (n=4), com o auxílio do software *Action Stat*



($p < 0,05$). Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão da absorbância média do tratamento pela absorbância média do controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da atividade antiproliferativa do lipossomo contendo 5% de extrato de *L. barbarum* (Figura 1 – A) mostram que, no menor tempo de avaliação (24 horas), as concentrações de 1, 5, 10, 25 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ apresentaram citotoxicidade para as células HuH7.5, ou seja, tiveram absorbâncias médias estatisticamente menores que as do controle negativo. Além disso, as viabilidades celulares (Tabela 1) para essas concentrações foram de 77,50%, 64,58%, 74,90%, 75,00% e 77,66%, respectivamente.

Tabela 1 – Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais hepáticas humanas, tratadas com as concentrações (mg mL^{-1}) dos encapsulados de goji berry a 5%, 10% e 20%, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	5%			10%			20%		
	24 h	48 h	72 h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	35,36	35,27	23,69	49,90	33,77	20,55	46,68	41,63	19,55
1	77,50	110,99	92,51	73,24	56,30	98,76	66,24	79,69	88,17
5	64,58	81,18	88,45	78,02	48,45	91,31	53,54	66,33	88,22
10	74,90	85,75	95,42	73,50	67,75	77,44	67,62	79,50	83,90
25	75,00	67,72	82,72	68,52	59,83	88,94	68,85	81,35	76,91
75	93,23	81,01	74,60	77,89	53,13	62,78	73,58	77,66	74,41
100	77,66	67,94	58,96	66,32	56,37	47,56	70,02	56,91	53,69

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Fonte: Autoria própria (2023).

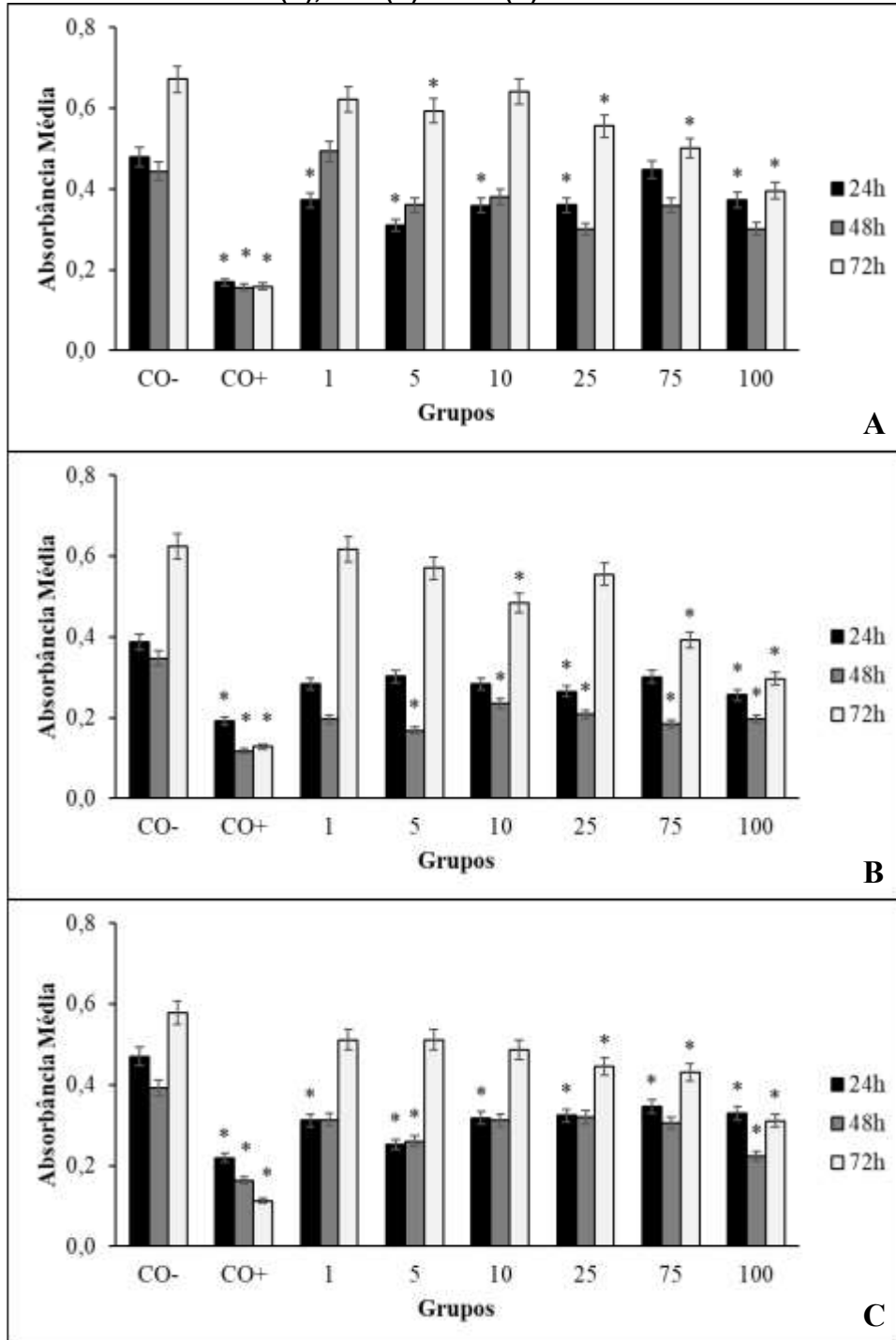
Comportamento semelhante foi verificado em algumas concentrações (5, 25, 75 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$) no tempo de avaliação de 72 horas (Figura 1 - A). As viabilidades celulares neste caso foram de 88,45%, 82,72%, 74,60% e 58,96%, em ordem. Observou-se a partir da concentração de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ um efeito dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração menor a viabilidade celular. Entretanto, no tempo de avaliação de 48 horas, nenhuma concentração apresentou citotoxicidade.

Zhang et al. (2013) obtiveram resultados positivos ao analisar a atividade antitumoral de Polissacarídeos de *Lycium Barbarum* (LBP) em células tumorais de fígado (SMMC-7721). Seus resultados mostraram que os polissacarídeos LBP-a4 inibiram o crescimento e induziam a apoptose das células através do aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, efeitos citotóxicos que podem também ter ocorrido no presente estudo.

A absorbância dos encapsulados com 10% de extrato (Figura 1 - B) indicou citotoxicidade nas concentrações de 25 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$, no tempo de avaliação de 24 horas. Suas viabilidades celulares (Tabela 1) foram de 68,52% e 66,32%, respectivamente. No tempo de 48 horas observou-se citotoxicidade nas concentrações de 5, 10, 25, 75 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e um efeito dependente da concentração. Além disso, viabilidades de 78,02%, 73,50%, 68,52%, 77,89% e 66,32%. Apenas as concentrações de 10, 75 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$

apresentaram absorvâncias médias inferiores que à do controle negativo no tempo de avaliação de 72 horas, com viabilidades celulares de 77,44%, 62,78% e 47,56%.

Figura 1 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais hepáticas humanas tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do encapsulado de goji berry a 5% (A), 10% (B) e 20% (C).



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. *Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).
Fonte: Autoria própria (2023)



Para o lipossomo contendo 20 % de extrato de goji berry, no tempo de avaliação de 24 horas, todas as concentrações mostraram-se citotóxicas (Figura 1 - C), com as viabilidades celulares (Tabela 1) variando atingindo 53,54%. No tempo de avaliação de 48 apenas as concentrações de 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$, continuaram apresentando efeito citotóxico para as células tumorais, com viabilidades celulares (Tabela 1) de 66,33% e 56,91%, respectivamente. Já na avaliação de 72 horas a citotoxicidade foi apresentada nas concentrações de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com viabilidades celulares (Tabela 1) de 76,91%, 74,41% e 53,69%, respectivamente.

CONCLUSÃO

Por meio dos dados do presente estudo foi possível confirmar a citotoxicidade e a atividade antitumoral dos extratos encapsulados da goji berry para a linhagem celular tumoral hepática humana, principalmente na maior concentração avaliada (100 $\mu\text{L mL}^{-1}$) para todos os lipossomos (5%, 10% e 20%). Além disso, é válido destacar que o lipossomo a 20% apresentou citotoxicidade em todos os tempos de avaliação e para todas as concentrações. Dessa forma, sugere-se que novos estudos sejam realizados, testando a citotoxicidade em outras linhagens tumorais com o intuito de assegurar o potencial uso do extrato encapsulado do goji berry para fins medicinais.

Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela infraestrutura e estímulo à produção científica e tecnológica de qualidade. E ao Laboratório de Biotecnologia e Ecotoxicologia – BIOECO, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N.R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**, 2011.

BO, R. LIU, Z.; ZHANG, J.; GU, P.; OU, N.; SUN, Y.; HU, Y.; LIU, J.; WANG, D. Mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides liposomes on activating murine dendritic cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 540–549, 2019.

BRUNORO, N.M.; ROSA, C.O.B. Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. **Rubio**, n. 2, 2016.

CHANG, H. I.; YEH, M. K. Clinical development of liposome-based drugs: Formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, 2012.



INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA; 2022a.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **O que causa o câncer?** Rio de Janeiro: INCA; 2022b.

INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Alimentação.** Rio de Janeiro: INCA; 2022c.

KULCZYNSKI, B.; GRAMZA-MICHALOWSKA, A. Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 2, p. 67-75, 2016.

LI, D.C.; ZHONG, X.K.; ZENG, Z.P.; JIANG, J.G.; LI, L.; ZHAO, M.M.; YANG, X.Q.; CHEN, J.; ZHANG, B.S.; ZHAO, Q.Z. Application of targeted drug delivery system in Chinese medicine. **Journal of Controlled Release**, 2009.

MOSMANN, Tim. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

VIDAL, K.; BUCHELI, P.; GAO, Q.; MOULIN, J.; SHEN, L.S.; WANG, J.; BLUM, S.; BENYACOUB, J. Immunomodulatory effects of dietary supplementation with a milk-based wolfberry formulation in healthy elderly: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Rejuvenation Research**, v. 15, n. 1, p. 89–97, 2012.

WANG, C.C.; CHANG, S.C.; INBARAJ, B.S.; CHEN, B.H. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 184–192, 2010.

ZHANG, Min *et al.* Characterization of *Lycium barbarum* polysaccharide and its effect on human hepatoma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 270-275, 2013.